

雄馬の繁殖生理に関する研究

Study of reproductive physiology in stallion.

獣医繁殖学(獣医臨床繁殖学) 菊池 元宏

本研究では雄馬の繁殖生理をより深く理解し、繁殖能力の判定や疾病の診断の精度をより向上させることを目的として、雄生殖器に直接的な影響を与える男性ホルモンの動態を把握した上で、精漿中に含まれる成分について検討を加えた。

1. 内分泌に関する検討

雄馬の血中テストステロン(T)とジヒドロテストステロン(DHT)の日内変動と 24 時間平均濃度に対する年齢と季節の影響を調べるために、延べ 22 頭の雄馬から季節ごとに 1 時間間隔で 24 時間にわたって採血し、両ホルモンを RIA 法で測定した。11～17 歳の雄馬(11～17 歳群)では、T 濃度は各季節とも明瞭な 2 つのピークが認められ、第 1 ピークは昼間、第 2 ピークは夜間に現れた。第 1 ピークの出現時刻と日出時の間には有意な相関が認められた($r=0.69$, $P<0.05$)。一方、DHT 濃度は低値で推移し、明らかなピークはみられなかった。20～21 歳の雄馬(20～21 歳群)では、T 濃度は二相性変化を示さず、また DHT 濃度は低値で推移し、明瞭なピークはみられなかった。11～17 歳群の両ホルモンの 24 時間平均濃度は夏季が最も高く、秋季が最も低かった(T: $P<0.01$ 、DHT: $P<0.05$)。20～21 歳群における T の 24 時間平均濃度は春季が最も高く、秋季が最も低かった($P<0.05$)。DHT 平均濃度は冬季と春季が夏季と秋季よりやや高かったが、有意な差ではなかった。同じ季節について群間の 24 時間平均濃度を比較すると、夏季における 11～17 歳群の T 24 時間平均濃度が 20～21 歳群より有意に高かった($P<0.05$)。しかし、それ以外では有意な差は認められなかった。したがって、雄馬の血中 T 濃度は二相性に変動し、その変動は 24 時間平均濃度とともに年齢

と季節に影響されるといえる。

2. 精漿無機物に関する検討

精漿成分に関する検討では、無機物と蛋白質に関する検討を行った。これらのうち無機物に関する検討では、明け6～24歳の雄馬23頭(サラブレッド種18頭、アングロアラブ種5頭)から、人工膣で採取した37検体の精液(冬季20例、夏季17例)について、精漿の無機物濃度を測定した。測定対象としたNa、K、Cl、Mg、Ca、無機リン(iP)、FeおよびZnの平均濃度はそれぞれ112.7mEq/l、19.8mEq/l、117.0mEq/l、8.67mg/dl、7.75mg/dl、8.08mg/dl、5.09 μ g/dlおよび165.4 μ g/dlであった。これらのうち、Naには季節差があり、冬季が夏季に比べ高かった($P<0.05$)。供試馬を年齢によって3群に分け、平均濃度の年齢差をみると、KおよびCaは6～10歳群が11～15歳群より、またZnは16～24歳群が他の2群より有意に低値であった($P<0.05$)。iPおよびZnは精子濃度と有意な正の相関($r=0.39$, $P<0.05$ および $r=0.41$, $P<0.05$)を示し、かつ、精液量と有意な負の相関($r=-0.35$, $P<0.05$ および $r=-0.53$, $P<0.01$)がみられた。このことは精漿のiPとZnの由来が副生殖腺ではなく精子形成の場である可能性を示しており、これらの測定が繁殖障害に陥った雄馬の異常部位の診断に有用なことを示唆している。

3. 精漿蛋白質に関する検討

蛋白質に関しては、精漿に含まれるものの分画を行った後、精漿蛋白質のうち鉄結合蛋白質として知られているトランスフェリンとラクトフェリンに関する検討を実施した。蛋白質の分画には分子量に従って分画できるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)法と、未変性の蛋白質を分画できるNative-PAGE法を用いて、それぞれ軽種馬精漿42検体および59検体の分析を行った。SDS-PAGE法では分子量約11,600～101,000の範囲に25の蛋白質分画が確認され、検体の90%以上に出現したものが11分画、逆に20%以下の検体にしか出現しないものが5分画認められた。また、精漿採取時期を季節別に比較すると、出

現率に季節差が認められるものが7分画認められたが、各蛋白分画の蛋白濃度を比較すると、殆どすべての分画で夏季に高い傾向を示した。一方、Native-PAGE 法では最も多いもので19分画が確認された。検体の70%以上に認められるものが13分画あったが、これらのうち7分画は射精前に分泌される尿道球腺液に認められる分画と一致した。以上のことから、SDS-PAGE および Native-PAGE 法における馬精漿蛋白質の基本的分画パターンを明らかにすることが出来た。

次に、馬精漿蛋白質のうちトランスフェリン(Tf)およびラクトフェリン(Lf)値の季節および加齢に伴う変動を明らかにするとともに、精液性状との相関性について検討を加えた。研究には6~27歳のサラブレッド種雄馬28頭から採取した延べ154検体の精液を供試し、サンドイッチELISA法により精漿TfおよびLf濃度を測定した。精漿Tf濃度は年齢との間に有意な正の相関を示したが($p < 0.0001$)、精子濃度、総精子数、運動精子率、不染精子率など精巣機能や精子の生存性および運動性に関する検査値との間には相関を示さなかった。精漿Lf濃度と年齢との間に相関は認められなかったが、造精機能を現す精子濃度および総精子数と強い正の相関が見られた($p < 0.0001$)。また、精漿Lf濃度は未熟精子率と正の相関が見られ($p < 0.01$)、正常精子率および不染精子率との間には有意な負の相関が見られ、精子成熟過程との関連性も示唆された。これらの結果から、Tfは造精機能の指標として用いることは不適切であると判断されたが、年齢との相関が強いことからTf値が加齢(老化)の指標となる可能性が示唆された。一方、精漿Lfは造精機能および精巣上体機能の指標となる可能性が示唆された。

4. 精子運動促進因子に関する検討

馬の精巣上体尾精子は精漿と混合すると運動が促進され、これには精漿に含まれる精子運動促進因子が関与していると考えられているが、その物質は特定されていない。そこで馬精漿から様々な成分を抽出し、還流して得た精巣上体尾精子に添加することで、馬精漿中の精子前進運動促進因子の検討を行った。実験には馬精巣上体尾をスキムミルク液(SM

液)で灌流して得た精子を使用した。また、馬精漿は15頭の種牡馬の精漿を混合したものをを用い、これを遠心処理した精漿を馬全精漿(HWsp)として、HWspから除蛋白精漿分画、限外濾過による分子量10,000以下の分画($\leq 10K$)、分子量3,000以下の分画($\leq 3K$)、エーテル抽出による精漿脂質分画および脱脂精漿分画を作製して試験に用いた。灌流した精子にHWspを添加した陽性対照を、SM液を添加した陰性対照と比較した結果、全てで++以上の運動性を示す精子率(活発運動精子率)の上昇が見られ、両者に有意差がみられた($p < 0.01$)。これと同様に有意な活発運動精子率の上昇が見られたのは $\leq 10K$ と $\leq 3K$ であり、精子前進運動促進因子として分子量3,000以下の蛋白質が考えられた。これらの蛋白質の特定をするため電気泳動法を試みたが、バンドを確認することは出来なかった。したがって精子前進運動促進因子が蛋白質でない可能性もあるため、プロテアーゼ処理によりHWsp中の蛋白質の生理活性を失わせた試料を用いたところ、精子の運動性の有意な増強は見られず、精子前進運動促進因子が蛋白質である可能性が再確認できた。またHWspを加熱処理した試料を作製し、同様に添加して精子の運動性を確認したところ、精子の運動性の有意な増強がみられた($p < 0.01$)。これらのことから、精子前進運動促進因子は分子量3,000以下の熱耐性蛋白質である可能性が示唆されたものの、特定することは出来なかった。

以上の結果から、雄馬の繁殖活動も雌と同様に季節変動を伴う事象が多く認められ、繁殖能力の判定や疾病の診断に際してはこれらの特徴を把握することが重要であることが明らかになった。また、馬精子の運動性を直接的に反映する物質は少なく、精漿に含まれている物質のうち精子前進運動促進因子として作用するのは分子量3,000以下の熱耐性蛋白質である可能性が示唆された。